

文章编号:1001-6880(2016)10-1618-04

# 三种卷柏属植物对人单核细胞白血病 U937 细胞的增殖抑制作用

于大永\*, 李小奇, 杨秀秀, 卢 轩, 冯宝民\*

大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622

**摘要:**为了观察中华卷柏、鹿角卷柏、卷柏等三种卷柏属植物的甲醇总提物、乙酸乙酯部位、石油醚部位样品对体外培养的人单核细胞白血病细胞 U937 细胞的增殖抑制作用。通过常规传代培养人单核白血病 U937 细胞, 再用噻唑兰比色法(MTT)检测不同浓度样品作用于 U937 细胞 12, 24 h 和 48 h 后的细胞增殖情况。中华卷柏和卷柏对 U937 细胞的增值抑制呈时间和剂量依赖性。鹿角卷柏对 U937 细胞的增值抑制呈剂量依赖性。药物作用 24 h 时, 三种卷柏属植物对 U937 细胞均有显著抑制作用, 其半数抑制浓度( $IC_{50}$ )分别为中华卷柏甲醇总提物 102.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙酸乙酯部位 87.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、石油醚部位 91.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 鹿角卷柏甲醇总提物 118.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙酸乙酯部位 126.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、石油醚部位 135.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 卷柏甲醇总提物 103.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙酸乙酯 174.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、石油醚 102.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。证明了三种卷柏均能有效抑制 U937 细胞的增殖, 为后续对卷柏属植物抗癌机制的研究提供了方向。

**关键词:**中华卷柏; 鹿角卷柏; 卷柏; U937; 细胞增殖

中图分类号:R285.5; R733.71

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.022

## Anti-proliferative Effect of Three *Selaginella* Plants on Human Monocytic Leukemia U937 Cell Line

YU Da-yong\*, LI Xiao-qi, YANG Xiu-xiu, LU Xuan, FENG Bao-min\*

School of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China

**Abstract:** To investigate the anti-proliferative effect of methanol extracts, ethyl acetate fraction, petroleum ether fraction extracted from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring, *Selaginella rosii* (Bak.) Warb, *Selaginella sinensis* (Desv.) Spring on human monocytic leukemia U937 cell line. U937 cells were cultivated by conventional way. MTT assay was used to measure the proliferation of U937 cells after treatment with different concentrations of methanol extract and different polar fractions from the *Selaginella* plant. *S. tamariscina* and *S. sinensis* caused the tumor cells death in a dose-dependent manner and time-dependent manner, *S. rosii* caused the tumor cells death in a dose-dependent manner. The methanol extracts, ethyl acetate fraction, petroleum ether fraction extracted from *S. tamariscina*, *S. rosii*, *S. Sinensis* can significantly inhibit the proliferation of U937 cells at  $IC_{50}$  of 102.54, 87.95, 91.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 118.69  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 135.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 95.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 103.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 174.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 102.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. In conclusion, the three *Selaginella* plants can significantly inhibit the proliferation of U937 cells.

**Key words:** *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring; *Selaginella rosii* (Bak.) Warb; *Selaginella sinensis* (Desv.) Spring; U937; cell proliferation

卷柏[*Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring]、鹿角卷柏[*Selaginella rosii* (Bak.) Warb.]、中华卷柏[*Selaginella Sinensis* (Desv.) Spring]均为蕨类植物门(Pteridophyta)石松纲(lycopida)卷柏目(Selag-

nellales)卷柏科(Selaginellaceae)卷柏属(*Selaginella*)植物<sup>[1]</sup>。卷柏始载于《神农本草经》, 述其“主治五脏邪气, 女子阴中寒热痛, 痘眼血闭绝子”<sup>[2]</sup>。卷柏又名长生不死草、九死还魂草、石莲花等, 多分布于我国江南地区<sup>[3]</sup>。味辛, 性平, 主治淤血经闭各种出血症、脱肛, 炒炭后可明显缩短出血与凝血时间。中华卷柏广泛分布于我国华北、东北等地, 其全草味淡、微苦、性凉, 有清热利尿、解毒散寒、消炎止

收稿日期:2016-06-13 接受日期:2016-08-09

基金项目:国家自然科学基金(31270398, 31540006); 辽宁省“百

千万人才工程”人选项目择优资助项目(2013921008)

\*通讯作者 Tel: 86-411-87402107; E-mail: yudayong@dlu.edu.cn;

fengbaomin@dlu.edu.cn

血、止泻的功效,用于肝炎、胆囊炎、气管炎、慢性肾炎、痢疾、湿疹、外伤出血及烫火伤,在山东省有些地区被用于治疗慢性气管炎<sup>[4]</sup>;鹿角卷柏分布于我国东北及华北,俄罗斯(远东地区)、朝鲜地区<sup>[5]</sup>。卷柏属植物作为中药已在民间广为应用,近年来卷柏的抗癌活性也屡见报道<sup>[6]</sup>。但目前关于鹿角卷柏和中华卷柏的相关研究较少。因此探索三种植物的抗癌活性的具体差别,对于筛选有效成分和开发新药具有巨大意义。实验分别采用卷柏、鹿角卷柏、中华卷柏的甲醇总提物、乙酸乙酯部位、石油醚部位中的提取物,通过 MTT 法对卷柏属植物的抗 U937 细胞增殖活性进行了初步研究。

## 1 材料与仪器

MTT(生工上海有限公司,货号 A100793,批号 B326BA2218);5 氟-尿嘧啶(天津金耀氨基酸有限公司,货号 1236,批号 1311201);DMSO、SDS、浓盐酸、异丁醇、PBS、青霉素链霉素均为市售。二氧化碳恒温培养箱(美国 SHELLAB 公司);超净工作台(苏州苏净集团安泰公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),酶标仪(Imark,美国 BIO-RAD 公司),SANYO-3750 立式灭菌锅(三洋公司);制冰机(德国 Scotsman Jencons 公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 三种卷柏样品的制备

卷柏、鹿角卷柏、中华卷柏均采于辽宁省大连市大黑山,由大连大学中药学高松教授鉴定。三种卷柏各取适量,粉碎后用甲醇回流提取。将提取物依次减压浓缩成浸膏后加适量水分散后用石油醚、乙酸乙酯萃取,各萃取液分别浓缩得到乙酸乙酯部位和石油醚部位,真空干燥后得到各部分的浸膏样品。实验前将上述各浸膏用 DMSO 分别配成质量浓度为 240 g/L 的母液备用(DMSO 培养基终浓度 < 0.1%)<sup>[7]</sup>。

### 2.2 细胞株的培养

人单核细胞白血病细胞株 U937 从 Human Sciences Research Resource Bank(日本人类科学基金会,东京,日本)获得,用含有 10% 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,培养于 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃、饱和湿度的细胞培养箱中,选取对数生长期细胞进行实验。

### 2.3 MTT 法对药物作用时间测定

使用血球计数板计数,调整细胞浓度为  $6 \times 10^4$

个/mL,将处于对数生长期的 U937 细胞种于 96 孔培养板中,依次加入浓度为 100 μg/mL 的中华卷柏、鹿角卷柏和卷柏。对照组加入 5-Fu 尿嘧啶(200 μM),阴性对照组中加入等量 RPMI-1640 培养液。在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件分别下培养 12、24、48 h,每组实验培养结束前 4 h 每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 g/L),4 h 后依次加入 150 μL 盐酸-SDS-异丁醇三联液。于 37 ℃ 恒温培养箱中放置过夜,用酶标仪检测 570 nm 处吸光度值,实验重复三次。

### 2.4 MTT 法对药物增殖抑制活性的测定

基本方法同上,在 96 孔板中依次加入浓度为 12.5、25、50、100 μg/mL 的中华卷柏和鹿角卷柏,浓度为 12.5、25、50、100、200 μg/mL 的卷柏(浓度为 100 μg/mL 时未检出 IC<sub>50</sub> 值),于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件分别下培养 24 h,重复三次。

### 2.5 数据统计分析

用 Excel 计算细胞存活百分率,实验结果以均值 ± 标准差表示。用 SPSS 软件计算 IC<sub>50</sub> 值,各组实验结果采用单因素方差分析,P < 0.05 为有统计学意义,P < 0.01 为有显著性差异。用 Origin 软件作图。

抑制率计算公式:细胞增殖抑制率(%) = (1 - 实验组吸光度 / 空白对照组吸光度) × 100%

## 3 实验结果

观察不同时间相同浓度的三种卷柏属植物总提物对 U937 细胞的抑制率,发现中华卷柏和卷柏随着药物作用时间的增长,U937 细胞的凋亡率也增加。鹿角卷柏对 U937 作用 24 h 细胞抑制率高于 48 h,并且中华卷柏和卷柏对细胞作用 24 h 和 48 h 测定的抑制率差异不大(组间比较 P > 0.05),因此选用 24 h 作为药物对细胞作用时间来进行浓度测定实验(图 1)。观察不同浓度的样品对 U937 细胞增殖的影响,发现三种卷柏属植物甲醇总提物、乙酸乙酯部位和石油醚部位对 U937 细胞增殖均有抑制作用。中华卷柏和鹿角卷柏浓度在 12.5 ~ 100 μg/mL 抑制率随样品浓度的增大而增强,呈现出剂量依赖性关系(图 2a、b)。卷柏浓度在 12.5 ~ 200 μg/mL 抑制率随样品浓度的增大而增强,呈现出剂量依赖性关系(图 2c)。中华卷柏和鹿角卷柏总提物对 U937 细胞抑制作用相似,但中华卷柏乙酸乙酯和石油醚两个极性部位的抑制活性明显强于鹿角卷柏并达到 70% 以上。卷柏的乙酸乙酯部位在浓度为 200

$\mu\text{g}/\text{mL}$  时对 U937 的增殖抑制作用最强, 达到 65% 以上。从  $\text{IC}_{50}$  值(图 3)来看, 中华卷柏的乙酸乙酯部位和石油醚部位对 U937 抑制活性最强。

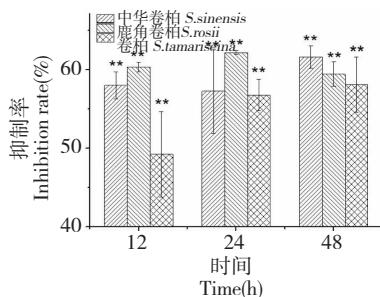


图 1 三种浓度为  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  的甲醇总提物不同时间内对 U937 细胞的抑制率( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Inhibition rate of three *Selaginella* plants methanol extract at different times and concentrations of  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  on U937 cell ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

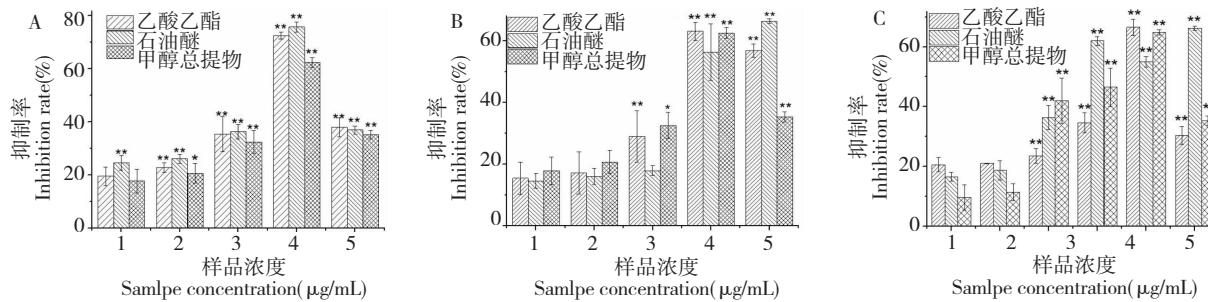


图 2 中华卷柏(A)、鹿角卷柏(B)及卷柏(C)提取物对 U937 细胞的抑制率( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Inhibition rate of *S. sinensis* (A), *S. rosii* (B) and *S. tamariscina* (C) extracts on U937 cell ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

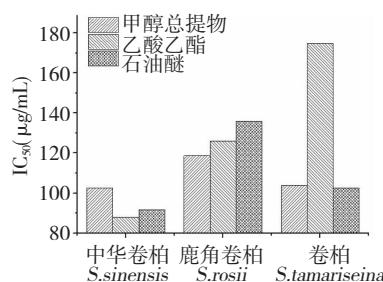


图 3 三种卷柏不同萃取部位样品的  $\text{IC}_{50}$  值

Fig. 3  $\text{IC}_{50}$  values of different extracts of three *Selaginella* plants

特点<sup>[11]</sup>。虽然卷柏属植物作为有抗癌活性的传统天然药物在临床的应用中也受到一定限制, 但其在急性髓系白血病的治疗中存在的优势是不可忽略的。因此研究三种卷柏属植物对 U937 细胞增殖的

## 4 讨论与结论

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是临幊上较为常见的一种血液系统恶性肿瘤, 以造幊细胞的异常增殖、分化受阻、凋亡受抑并引发正常的血细胞减少为主要特征<sup>[8]</sup>。AML 临幊治疗效果不佳, 迫切需要找到更好的治愈方法<sup>[9]</sup>。化疗是目前临幊治疗白血病的一个主要手段, 但是化疗药物的毒副作用较大, 对机体正常的细胞亦具有较强的破坏力, 导致患者免疫功能降低<sup>[10]</sup>。近年来, 天然药物因其治疗效果好, 不易产生副作用的优势, 逐步成为解决世界性癌症难题的更优方法。目前从红豆杉中提取的紫杉醇和长春花中提取的长春新碱作为治疗癌症的药物广泛应用于临幊治疗。然而天然药物成分相对复杂, 具有多靶点、多环节、多通路的

影响对 AML 的研究有重大意义。

本实验通过 MTT 法研究中华卷柏、鹿角卷柏、卷柏三种卷柏属植物对 U937 的增殖抑制作用。证明了中华卷柏、鹿角卷柏和卷柏对 U937 细胞增殖均有较强抑制作用。在一定浓度范围内, 中华卷柏和鹿角卷柏的活性更强, 二者具有替代中药卷柏的潜质。有研究表明, 卷柏不同萃取部位对 U937 细胞增殖均有抑制作用, 而对人正常淋巴细胞无影响。水萃取部位能有效提高抑癌基因 p53 的表达, 并诱导细胞周期阻滞于 G1 期<sup>[12]</sup>。卷柏作为最常见的卷柏属植物被广泛研究, 双黄酮是卷柏抗肿瘤的活性成分, 作用机制主要为:(1)细胞毒作用;(2)诱导细胞凋亡, 包括上调 p53 基因表达, 激活 caspase 系统, 抑制 COX-2 等炎症因子;(3)阻滞恶性肿瘤细胞的侵袭、转移<sup>[13]</sup>。中华卷柏和鹿角卷柏的抗癌机制还

有待于进一步研究。

## 参考文献

- 1 Zhang ZY(张志耘). *Flora of China(中国植物志)*. Beijing: China Medical Science Press, 1998. Vol 6,86.
- 2 Sun XY(孙星衍), Sun FY(孙冯翼). *Shennong's Herbal Classic (神农本草经)*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1963;24.
- 3 Plants in Jiangsu(江苏植物所). *Xinhua Herbal Outline(新华本草纲要)*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House, 1980;56.
- 4 Cao XZ(曹习诊). 182 cases of heat treatment in Chun white root decoction. *J Sichuan TCM (四川中医)*, 2011, 19(11): 47.
- 5 Liu BD(刘保东), Zhang DW(张大维), Bao WM(包文美), et al. Studies on the morphological development gametophytes of selaginellaceae. *Bull Bot Res(植物研究)*, 1993, 3: 250-256.
- 6 Zeng QH(曾庆海), Tu C(涂超), Fan F(范凡), et al. Research progress of Selaginellin and the anti-tumor activity of Selaginella. *Anti-tumor Pharm (肿瘤药学)*, 2012, 2: 402-406.
- 7 Pei JS, Liu CC, Hsu YN, et al. Amentoflavone induces cell-

(上接第 1663 页)

- 21 Feng X, et al. A pair of sesquiterpene glucosides from the leaves of *Nicotiana tabacum*. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12: 252-256.
- 22 Yang CY (杨彩艳), et al. Chemical structure and bioactivity of cis-5'-oxopropylnicotine. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41:689-693.
- 23 Chen YK (陈永宽), et al. Isolation and identification of glycosidic components from flue-cured tobacco Leaves. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2012, 24:1561-1564.
- 24 Secretan B, et al. A review of human carcinogens-Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*, 2009, 10:1033-1034.
- 25 Wang Z (王珍), et al. Study advances on carcinogens and their metabolites in urine of smokers. *J Hygiene Res (卫生研究)*, 2008, 37:757-759.
- 26 Yan JC (严家川), et al. Effect of nicotine on microglia in Alzheimer's disease rats. *Chongqing Med (重庆医学)*, 2007, 36:2524-2526.
- 27 Ferchmin PA, et al. Tobacco Cembranoids block behavioral sensitization to nicotine and inhibit neuronal acetylcholine receptor function. *J Neurosci Res*, 2001, 64:18-25.
- 28 Eterovic' VA, et al. Protective activity of (1S,2E,4R,6R,

cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells via Mitochondria-dependent pathway. *in vivo*, 2012, 26: 963-970.

- 8 Chen ZG(陈占国), LI Y(李艳), Tong YJ(童永清), et al. Progress in molecular diagnostic techniques for leukemia. *Chin J Lab Med (中华检验医学杂志)*, 2015, 3:206-210.
- 9 Maiga A, Lemieux S, Pabst C, et al. Transcriptome analysis of G protein-coupled receptors in distinct genetic subgroups of acute myeloid leukemia: identification of potential disease-specific targets. *Blood Cancer J*, 2016, 6:431.
- 10 Guo XL(郭晓玲). Updates in treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Clin Foc (临床荟萃)*, 2014, 29:1108-1113.
- 11 Zhang J(张靖), Yang L(杨柳), Gao WY(高文远). The development of researches on the natural antineoplastic. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2010, 41:1014-1020.
- 12 Lee IS, Kim SU, Lee YS, et al. Animal cell technology: Basic & applied aspects. part II. Germany Berlin: Springer Netherlands, 1998, 83-89.
- 13 Zou H(邹辉), Xu KP(徐康平), Tan GS(谭桂山). Advances in research on chemical constituents and pharmacological activities of Genus *Selaginella*. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2012, 24:1655-1670.

7E,11E)-2,7,11-embratriene-4,6-diol analogues against diisopropylfluorophosphate neurotoxicity: preliminary structure-activity relationship and pharmacophore modeling. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21:4678-4686.

- 29 Zhao Y, et al. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis. *J Ethnopharmacol*, 2014, 156:147-154.
- 30 Tanaka H, et al. Antibacterial activity of sesquiterpenoids from tobacco leaves elicited by *Pseudomonas solanacearum* and tobacco mosaic virus. *Nippon Shokubutsu Byori Gakkaiho*, 1983, 49: 501-507.
- 31 Zhao Y, et al. Anti-hepatitis B virus active constituents of *Artemisia capillaries*. *Fitoterapia*, 2014, 95:187-193.
- 32 Wang HL, et al. Swerpunilactones A and B, the first example of xanthone and secoiridoidheterodimers from *Swertia punicea*, *S. hispidalyx*, and *S. yunnanensis*. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54:2710-2712.
- 33 Chen SD, et al. Houttuynoids A-E, Anti-herpes simplex virus active flavonoids with novel skeletons from *Houttuynia cordata*. *Org Lett*, 2012, 14:1772-1775.
- 34 Zakaria I, et al. Flavonoids with antiplasmoidal and cytotoxic activities of *Macaranga triloba*. *Fitoterapia*, 2012, 83:968-972.